



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 30 516 A1** 2004.01.15.

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 30 516.1  
(22) Anmeldetag: 06.07.2002  
(43) Offenlegungstag: 15.01.2004

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C07K 16/00**  
**A61K 39/395**

(71) Anmelder:  
Müller-Hermelink, Hans Konrad, Prof. Dr., 97082  
Würzburg, DE; Vollmers, Heinz, Prof. Dr., 97084  
Würzburg, DE

(74) Vertreter:  
Pöhner, W., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
97070 Würzburg

(72) Erfinder:  
gleich Anmelder

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu  
ziehende Druckschriften:  
**DE 41 07 154 A1**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gem. § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Humaner monoklonaler Antikörper**

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein humaner monoklonaler Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich besitzen. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, daß wenigstens eine variable Region der leichten und/oder der schweren Ketten substantiell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweist. Des weiteren sieht die Erfindung Verfahren zur Herstellung des Antikörpers vor, die Verwendung des Antikörpers zur Bekämpfung von Tumoren und ein Arzneimittel und Diagnostikum, welche den Antikörper enthalten.

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft einen humanen monoklonalen Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich aufweisen, oder ein funktionelles Fragment davon. Desweiteren sieht die Erfindung Verfahren zur Herstellung des Antikörpers vor, die Verwendung des Antikörpers zur Bekämpfung von Tumoren, und ein Arzneimittel und ein Diagnostikum, welche den Antikörper enthalten.

## Stand der Technik

[0002] Die derzeitigen Verfahren zur Behandlung von Krebs umfassen eine operative Entfernung des Tumors, Strahlenbehandlungen und Chemotherapie. Ein wesentlicher Nachteil jeder dieser Methoden ist darin zu sehen, daß sie nicht spezifisch auf die Tumorzellen ausgerichtet sind. So kann es bei einer operativen Entfernung beispielsweise vorkommen, daß nicht der ganze Tumor erfaßt wird, was dazu führt, daß sich ein neuer Tumor entwickelt und gegebenenfalls Metastasen gebildet werden, die sich an weiteren Stellen im Körper festsetzen. Bei der Behandlung von Tumoren mit Strahlen oder chemotherapeutischen Mitteln führt die fehlende Selektivität häufig dazu, daß auch gesunde Zellen durch die eingesetzten Mittel geschädigt werden. Die nachteilige Folge hiervon ist, daß die Dosen an Strahlung oder chemischen Wirkstoffen nicht so hoch gewählt werden können, daß sie alle Krebszellen abtöten. Ein wesentlicher Teil der heutigen Krebsforschung zielt daher darauf ab, effektivere und insbesondere selektiv wirkende Verfahren und Mittel zur Bekämpfung von Tumoren zu finden.

[0003] Wie immunologische Studien gezeigt haben, ist auch dann, wenn das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann, eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar. Diese Aktivität reicht jedoch nicht aus, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung von Tumoren ist daher, von der Immunantwort des Patienten stammende Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und therapeutisch einzusetzen.

[0004] Ein Verfahren nach dem Stand der Technik, das diesen Weg beschreitet, ist unter dem Namen Hybridoma-Technik bekannt. Es beruht auf der In-Vitro-Gewinnung von zellulären Hybriden, die durch Zellfusion von normalen Lymphozyten mit unbegrenzt lebens- u. teilungsfähigen Myelomzellen gewonnen werden. Die hierbei erzeugten Hybridom-Zellen weisen die Eigenschaften beider Elternzellen auf. Dementsprechend besitzen sie die Fähigkeit der Lymphozyten, Antikörper zu produzieren, und die Fähigkeit der Myelomzelle zur unbegrenzten Teilung und damit zur Produktion der Antikörper in großen Mengen.

[0005] Jede aus der Fusion resultierende Hybridzelle stellt monoklonale Antikörper her, dessen Spezifität von der ursprünglichen Lymphozyten-Zelle bestimmt wird. Die Hybridom-Zellen werden vermehrt und dann diejenigen selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Die Kultivierung dieser Auswahl und deren Isolierung führt zu hochspezifisch reagierenden Antikörpern, welche nur mit einer bestimmten antigenen Determinante reagieren. Monoklonale Antikörper, welche spezifisch an Antigene von Tumoren binden, eröffnen daher vielversprechende Möglichkeiten für Diagnose und Therapie von Tumorzellen.

## Aufgabenstellung

[0006] Zur Verbesserung der Verfahren und Mittel im Kampf gegen Krebs besteht daher der Bedarf an derartigen monoklonalen Antikörpern. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen humanen monoklonalen Antikörper, Verfahren zu dessen Herstellung und aus dem Antikörper abgeleitete Diagnostika und Arzneimittel anzugeben, die eine hohe Spezifität für Antigene verschiedener Tumore aufweisen und sich daher für eine tumorspezifische Therapie und Diagnose gut eignen.

[0007] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe hinsichtlich des monoklonalen Antikörpers dadurch gelöst, daß wenigstens eine variable Region der leichten Ketten substanziell jeweils die in Anlage 2 und/oder der schweren Ketten substanziell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweisen.

[0008] Aus chemischer Sicht sind Antikörper Immunglobulin-Moleküle. Diese Moleküle weisen jeweils zwei identische leichte und zwei identische schwere Ketten auf, die durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Jede der Ketten enthält eine Region von etwa 110 Aminosäuren mit variabler Sequenz, während der verbleibende Rest jeder Kette einen Bereich mit konstanter Sequenz aufweist. Die variablen Regionen von leichter und schwerer Kette ihrerseits umfassen jeweils mehrere hypervariable Regionen, welche für die Bindung der Antigene verantwortlich sind. Die spezielle Ausbildung der hypervariablen Regionen bestimmen daher die spezifischen Eigenschaften des Antikörpers.

[0009] Wie klinische Tests belegen, begründet die Ausbildung der genannten variablen Bereiche des erfindungsgemäßen Antikörpers gemäß der angegebenen Aminosäuren-Sequenz eine hohe spezifische Wirksamkeit gegenüber den Antigenen der untersuchten Tumorzellen. Da die auf Tumorzellen auftretenden Antigene auf Normalzellen nicht vorhanden sind, zeigen vorliegende Antikörper gegenüber normalen Zellen erwartungs-

gemäß keine oder nur geringe Bindung.

[0010] Erfindungswesentlich ist die substanzielle Gleichheit einer der variablen Regionen der leichten oder der schweren Ketten mit der erfindungsgemäßen Sequenz. Die substanzielle Gleichheit bedeutet dabei eine überwiegende Übereinstimmung der genannten Bereiche. Geringfügige Modifikationen oder Substitutionen der Ketten sind in vorliegender Erfindung mit eingeschlossen, sofern der monoklonale Antikörper oder der funktionelle Teil davon tumorspezifische Eigenschaften beibehält.

[0011] Tumorspezifische monoklonaler Antikörper nach dem Stand der Technik betreffen in der überwiegenden Zahl der Fälle von Mäusen hergeleitete Antikörper. Jene Antikörper weisen in nachteiliger Weise jedoch eine stark eingeschränkte Einsatzmöglichkeit auf, da Mausantikörper bei Anwendung auf den Menschen durch dessen Immunsystem als Fremdprotein erkannt und neutralisiert werden können noch bevor sie ihre therapeutische Wirkung entfalten.

[0012] Die Erfindung geht demgegenüber von humanen monoklonalen Antikörpern aus, welche diese Beschränkungen bei Einsatz in der Humanmedizin nicht aufweisen. Diese Antikörper weisen Sequenzen der hypervariablen Kettenbereiche auf, die substanziell denen von menschlichem Immunglobulin entsprechen. Die Antikörper können daher nach Erkennung der Determinanten oder Epitope der ihnen entsprechenden Antigene ungehindert an den betreffenden Zellen anbinden, ohne daß eine Abwehrreaktion des Immunsystems erfolgt. Bei einer Kopplung der erfindungsgemäßen Antikörper mit diagnostischen und therapeutischen Mitteln sind vorliegende Antikörper somit in vorteilhafter Weise zur Früherkennung und effektiven Behandlung von Tumoren unterschiedlicher Art geeignet.

[0013] Bei der Lösung der Aufgabe hinsichtlich des Herstellungsverfahrens wird vorgeschlagen, die humanen monoklonalen Antikörper vorzugsweise mittels der Hybridoma-Technik zu erzeugen. Gemäß einem Merkmal der Erfindung werden hierzu B-Lymphozyten aus einem lymphatischen Organ, vorzugsweise der Milz oder des Lymphknotens, eines Karzinom-Patienten entnommen. Diese Lymphozyten sind infolge des vorhandenen Karzinoms zur Bildung derjenigen Antikörper stimuliert, welche speziell auf die Antigene der vorliegenden Tumorzellen reagieren.

[0014] Die Lymphozyten werden in vitro jeweils mit einer Myelom-Zelle fusioniert. Gemäß vorliegender Erfindung werden hierbei die Heteromyelomzellen HAB-1 sowie deren Subklone verwendet. Die Heteromyelomzelle HAB-1 ist spezifiziert in der Literatur: Faller, G et al., HAB-1, BrJCancer 62, 595-8 (1990). Gleichmaßen können Subklone der HAB-1-Zelle Verwendung finden, die als HAB-1.X bezeichnenbar sind. Die entstandenen Zellklone besitzen wie die originären B-Lymphozyten die Eigenschaft, Antikörper zu produzieren. Die Spezifität dieser Antikörper wird dabei durch die ursprüngliche Lymphozyten-Zelle bestimmt. In vorliegendem Fall bedeutet dies, daß auch die von den Zellklonen produzierten Antikörper mit den Antigenen des speziell vorliegenden Tumors korrespondieren. Nach Selektion derjenigen Zellen, die jeweils Antikörper der gewünschten Spezifität synthetisieren, werden diese Zellen kultiviert und dabei von jeder der Hybridzellen jeweils monoklonale Antikörper in unbegrenzter Menge produziert.

[0015] Gemäß einem Merkmal der Erfindung werden bei dem vorgeschlagenen Verfahren insbesondere Lymphozyten von Patienten entnommen, die ein Karzinom des

- Magen
- Dickdarm
- Lunge
- Bauchspeicheldrüse
- Speiseröhre
- Prostata
- Brust

aufweisen.

[0016] Neben einer Herstellung der vorliegenden humanen monoklonalen Antikörper durch die Hybridoma-Technik schließt die Erfindung auch andere Herstellungsmethoden ein. Vorgeschlagen wird, insbesondere bei der Herstellung kleinerer funktioneller Fragmente, die direkte Synthese mittels der dem Fachmann bekannten Rekombinanten-Methode oder der Herstellung mittels der bekannten Phagenbankmethode (phage display).

[0017] Die Vermehrung erfolgt unter Anwendung der bekannten Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase chain reaction = PCR).

[0018] Das PCR-Verfahren ist dem Fachmann bekannt, beispielsweise aus dem US-Patent 4,683,195. Es dient der gezielten Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments und wird mit Vorteil dann angewandt, wenn DNA-Abschnitte nur in geringen Spuren vorliegen. Das Verfahren ermöglicht, eine bekannte DNA-Sequenz unter einer Vielzahl ähnlicher Sequenzen zu erkennen und in vitro in kurzer Zeit stark zu vermehren. Hierbei kann eine spezielle DNA-Sequenz innerhalb einer Zeitspanne von ca. 3 h etwa 100.000fach vervielfältigt werden.

[0019] Bei Anwendung des vorliegenden Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgemäßen monoklonalen



Antikörper, oder von funktionellen Fragmenten davon, wird RNA der Hybridomzellen, die tumorspezifische monoklonale Antikörper produzieren, in vitro mittels reverser Transcriptase in komplementäre doppelsträngige cDNA umkopiert. Anschließend wird die cDNA, welche funktionelle Fragmente der variablen Bereiche der leichten und schweren Ketten enthält, mittels PCR vervielfältigt. Die PCR-Produkte werden gereinigt, extrahiert und anschließend kloniert.

[0020] Der Aufbau des konstanten Bereichs der schweren Kette eines Antikörpers bestimmt dessen Isotyp und legt die Effektor-Funktion des Antikörpers fest. Bei Immunglobulin besteht die konstante Region der schweren Ketten aus einer der fünf in der Literatur mit  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  oder  $\epsilon$  bezeichneten Sequenzen, die konstante Region der leichten Ketten aus einer der Sequenzen  $\kappa$  oder  $\lambda$ . Der unterschiedliche Aufbau der schweren Ketten führt zu den fünf Immunglobulin-Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die Antikörper gemäß vorliegender Erfindung gehören in der Regel der Klasse IgM an, wobei sowohl leichte Ketten der Klasse  $\lambda$  als auch  $\kappa$  auftreten können. Ebenso ist eine Ausbildung des Antikörpers gemäß Klasse IgG vorgesehen.

[0021] Die Erfindung umfaßt monoklonale Antikörper als auch funktionelle Fragmente davon. Dabei ist die Funktionalität der genannten Fragmente dadurch gekennzeichnet, daß sie Eigenschaften des Antikörpers aufweisen. Diese können beispielsweise darin bestehen, daß sie eine Bindungsfähigkeit gegenüber Antigenen oder eine Spezifität für Tumorzellen besitzen, oder aufgrund des Aufbaus ihres konstanten Bereichs eine Effektor-Funktion aufweisen. Gemäß einem Merkmal der Erfindung sind insbesondere Fragmente einbezogen, welche gemäß bekannter Nomenklatur (z. B. Cell Biophysics, 22 (1993), S. 189 – 224) einer der Gruppen

$V_L$ ,  $V_H$ , Fv, Fc, Fab, Fab',  $F(ab')_2$

angehören. Dabei umfaßt die Gruppe

$V_L$  Fragmente, welche den variablen oder den variablen und konstanten Bereich der leichten Ketten einschließen

$V_H$  Fragmente, welche den variablen Bereich oder den variablen und den konstanten Bereich der schweren Ketten einschließen

Fv Fragmente, welche die variablen Regionen der schweren und der leichten Ketten oder Teile davon einschließen

Fc Fragmente, welche die konstanten Regionen der schweren Ketten oder Teile davon einschließen

Fab Fragmente, welche größer als die Fragmente der Gruppe Fv sind

Fab' Fragmente, welche größer als die Fragmente der Gruppe Fab sind

$F(ab')_2$  Fragmente, welche die variablen Bereiche beider schwerer und beider leichter Ketten oder Teile davon enthalten und optional die ersten konstanten Bereiche beider schweren Ketten oder Teile davon.

[0022] Durch Verwendung der genannten Fragmente ist es möglich, spezielle Anforderungen für bestimmte Anwendungen zu realisieren. Eine Anpassung der Eigenschaften des Antikörpers oder dessen funktioneller Fragmente läßt sich gemäß einem Merkmal der Erfindung auch dadurch erreichen, daß einzelne Aminosäure-Gruppen substituiert und/oder hinzugefügt und/oder entfernt sind. Eingriffe dieser Art führen dazu, daß beispielsweise die Stabilität oder die Selektivität des Antikörpers bzw. dessen funktioneller Fragmente modifiziert werden, dessen globalen Eigenschaften, wie beispielsweise die Bindungsfähigkeit gegenüber Tumor-Antigenen, jedoch erhalten bleiben.

[0023] Die Antikörper bzw. deren funktionelle Fragmente gemäß vorliegender Erfindung können mit weiteren Wirkstoffen verbunden werden. Durch eine Ankopplung derartiger Substanzen werden die Anwendungsbereiche des vorliegenden Antikörpers wesentlich erweitert. Insbesondere lassen sich die humanen monoklonalen Antikörper gemäß vorliegender Erfindung hierdurch für diagnostische Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen und für therapeutische Verfahren zur Bekämpfung von Tumorzellen einsetzen.

[0024] Gemäß einem Merkmal der Erfindung sind insbesondere folgende Substanzen vorgesehen:

- eine radiaktive Substanz,
- und/oder ein Farbstoff,
- und/oder ein Enzym,
- und/oder ein Immunotoxin,
- und/oder ein Wachstumshemmer,

wobei diese Wirkstoffe

- zum qualitativen oder quantitativen Nachweis,
- zur Verringerung der Proliferation,
- zur Erzeugung der Apoptose
- zur Vermeidung von Metastasenbildung

von Tumorzellen dienen können.

[0025] Der Nachweis von Tumorzellen wird häufig mit dem Fachleuten unter dem Namen Immunoassay bekannten Verfahren geführt, dessen Grundlage die Antigen-Antikörper-Reaktion ist. Um aus dieser Reaktion quantitative Aussage gewinnen zu können, wird der Antikörper gemäß vorliegender Erfindung mit einer gut

nachweisbaren Markierungssubstanz gekoppelt. Substanz und Kopplung sind dabei so gewählt, daß die immunologischen Eigenschaften der Komponenten weitgehend erhalten bleiben. Die bekanntesten Immunoassays sind Radioimmunoassay, Enzymimmunoassay und Fluoreszenzimmunoassay. Im Ergebnis ermöglichen die an die Antikörper angekoppelten diagnostischen Substanzen empfindliche und zuverlässige Verfahren zur Früherkennung von Krebs.

[0026] Die genannten cytotoxischen Substanzen zielen auf eine Verminderung der Lebens- oder Teilungsfähigkeit der Tumorzellen. Sie bewirken alternativ eine Unterdrückung der DNA-Synthese, Unterdrückung der Zellteilung, Apoptose der Zellen oder einen nicht apoptotischen Zelltod. Sie bringen damit das Wachstum von Tumorzellen zum Stillstand oder bringen Tumorzellen zum Absterben.

[0027] Durch Kopplung der genannten Substanzen mit den selektiv gegen Krebszellen wirksamen Antikörpern gemäß vorliegender Erfindung lassen sich somit gezielt Tumore unterschiedlicher Art wirkungsvoll bekämpfen. Die Erfindung sieht hierbei insbesondere

- die Diagnose
- und/oder Prophylaxe
- und/oder Therapie

folgender Tumore vor:

- Karzinom des Dickdarm, der Bauchspeicheldrüse, der Prostata, der Gebärmutter, der Eileiter, der Nebenniere und/oder der Lunge,
- Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre oder der Lunge
- Magen-Karzinom
- duktales Karzinom der Brust.

[0028] Schließlich umfaßt vorliegende Erfindung auch ein Arzneimittel und ein Diagnostikum, die jeweils dadurch gekennzeichnet sind, daß deren Wirkstoffe den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthalten. Die genannten Mittel enthalten in der Regel weitere Zusatzstoffe, wie physiologische Lösungen, Lösungsmittel, Glycole, Öle oder dergl. im Stand der Technik bekannte Substanzen.

## METHODEN, BEISPIELE UND EINZELHEITEN

### Antikörper PM-2

Schwere Kette (VH)

Aminosäure-Sequenz

siehe Anlage 1

DNA-Sequenz

siehe Anlage 1

Leichte Kette (VL)

Aminosäure-Sequenz

siehe Anlage 2

DNA-Sequenz

siehe Anlage 2

### Methode 1

Immortalisierung von Lymphozyten und Primärtestung der Antikörper

[0029] Zur Immortalisierung werden die Lymphozyten mit einer Variante des Heteromyeloms HAB-1 nach Standardprotokoll fusioniert und kultiviert. Kurz zusammengefaßt, Lymphozyten werden mit HAB-1 Zellen mittels PEG verschmolzen. Die Triome werden auf vier 24-Lochplatten ausgesät. Die durchschnittliche Wachstumsfrequenz beträgt 80-90%, 50% der wachsenden Klone sezernieren Immunglobuline.

[0030] Die erste Austestung der sezernierten humanen monoklonalen Antikörper erfolgt im ELISA, um den Isotyp zu ermitteln. Der nächste Test ist eine immunhistochemische Färbung auf Cryoschnitten des autologen Tumors.

### Benötigte Medien

- RPMI 1640 (Firma PAA) ohne Zusätze
- RPMI 1640 mit HAT-Zusatz (HAT-Supplement, Firma PAA) sowie 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin

### Immortalisierung

- HAB-1 (Fusionspartner) zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen
- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- eingefrorene Lymphozyten (aus Milz oder Lymphknoten) auftauen und zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen, ebenfalls zentrifugieren
- beide Pellets jeweils in 10 ml RPMI ohne Zusatz aufnehmen und in der Neubauer-Zählkammer zählen
- im Verhältnis von 1:2 – 1:3 HAB-1 zu Lymphozyten, fusionieren
- die Zellpellets nach dem zweiten Waschvorgang zusammen geben, mischen und 8 min bei 1500 U/min zentrifugieren
- das zuvor bei 37 °C aufgewärmte PEG (Polyethylene Glycol 1500, Firma Roche) vorsichtig tröpfelweise auf das Pellet unter leicht rotierenden Bewegungen des 50 ml Röhrchens laufen lassen
- leicht resuspendieren und dann genau 90 sek. im Wasserbad bei 37 °C rotieren lassen
- danach wird das PEG mit RPMI ohne Zusätze heraus gewaschen (zwei volle 10er Pipetten)
- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- 24-Well-Platten ausplattieren mit 1 ml pro Well RPMI mit HAT-Zusatz
- das Pellet lösen in RPMI mit HAT-Zusatz
- jeweils einen halben ml der Zellen in ein 24-Well pipettieren
- Fusionsplatten in den Brutschrank stellen
- wöchentlich Mediumwechsel mit RPMI mit HAT-Zusatz

### Methode 2

#### Molekulare Charakterisierung der Antikörper

[0031] Zur Sequenzierung der monoklonalen Antikörper wird cDNA aus gesamt RNA (RNase Kit, Quiagen) von Triomen hergestellt (M-MLV reverse transcriptase, Gibco). Anschließend werden die entsprechenden VH-Gene durch PCR-Amplifikation vervielfältigt (Tag Polymerase, MBI-Fermentas). Die PCR-Produkte werden über Gel-Elektrophorese gereinigt und extrahiert. Nach dem Klonieren der PCR-Produkte (pCR-Script Amp SK+cloning kit, Stratagene) werden die positiven Klone sequenziert (DyeDeoxy Termination cycle sequencing kit, Applied BioSystems). Die Sequenzen werden mit Hilfe von Dnasis für Windows, Genbank und V-Base Databases analysiert (Vollmers et al., 1998).

#### Immunhistochemische Charakterisierung

[0032] Antikörper, die mit dem autologen Tumor reagieren, werden auf einem Panel von Normalgeweben und Tumorgeweben im Immunperoxidase Test (Protokoll siehe unten) untersucht, um einen Überblick über die Reaktion des Antikörpers und die Verteilung des Antigens zu erhalten.

[0033] Antikörper, die spezifisch mit den Tumorzellen reagieren und nicht mit gesundem Gewebe, werden weiter untersucht. Zunächst auf Tumoren des gleichen Typs verschiedener Patienten, dann auf Tumoren anderer Organe und schließlich auf Normalgeweben. Eine nähere Charakterisierung des Antikörpers und des Antigens erfolgt nur, wenn das Reaktionsmuster des Antikörpers auf eine zumindest eingeschränkte Spezifität mit malignem Gewebe schließen läßt.

#### Immunperoxidasefärbung auf Kryoschnitten und Cytospins

- Objektträger (OT)
- OT's nach dem Schneiden mindestens 2 h trocknen lassen
- OT's 10 min in Aceton stellen
- 30 min trocknen lassen
- 3 × mit Tris-NaCl waschen und anschließend 5 min in Tris-NaCl stehen lassen
- mit 100 µl Milchpulver (3 % in PBS) absättigen für 15 – 30 min
- 3 × mit Tris-NaCl waschen
- 100 µl des jeweiligen 1. Antikörpers:
- für negative Kontrolle RPMI

- für positive Kontrolle CK8 1:50 mit BSA/PBS oder CAM 5.2 1:10 mit BSA/PBS (BSA 0,5%ig in PBS)
- 30 min inkubieren lassen
- 3 × mit Tris-NaCl waschen
- 100 µl des jeweiligen 2. Antikörpers:
- Rabbit Anti Maus Peroxidase konjugiert 70 % PBS + 30% Humanserum + 1:50 AK
- Rabbit Anti Human IgM Peroxidase konjugiert 70 % PBS + 30 % Kaninchenserum + 1:50 AK
- 30 min inkubieren lassen
- 3 × mit Tris-NaCl waschen
- OT's 10 min in PBS stellen
- 1 DAB-Tablette und 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tablette in 1 ml Leitungswasser lösen
- 100 µl Substrat auf die OT's pipettieren und für 10 min inkubieren lassen
- mit Aqua dest. spülen
- OT's für 5 min in Hämalun stellen
- 15 min fließend wässern
- OT's in Aqua dest. stellen und mit Glyceringelatine eindecken

#### IMMUNPEROXIDASEFÄRBUNG AUF PARAFFINSCHNITTEN Entparaffinierung

- Xylol 1 5 min
- Xylol 2 5 min
- 100% Ethanol 1 5 min
- 100% Ethanol 2 5 min
- Methanol (70 ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µl) 5 min
- 90% Ethanol 1 3 min
- 90% Ethanol 2 3 min
- 80% Ethanol 1 3 min
- 80% Ethanol 2 3 min
- 70% Ethanol 1 3 min
- 70% Ethanol 2 3 min

1 × mit Tris/NaCl waschen

kochen: 300 ml dest. H<sub>2</sub>O in den Schnellkochtopf, Citronensäure (pH 5,5) in den Einsatz füllen, Objektträger (OT) 5 min kochen

15 min blocken mit BSA/PBS, 150 µl pro OT

1 × mit Tris/NaCl waschen

1. Antikörper, 150 µl pro OT, 2,5 h in feuchter Kammer im Brutschrank inkubieren,

3 × mit Tris/NaCl waschen

2. Antikörper, 150 µl pro OT, 45 min in feuchter Kammer bei RT inkubieren

3 × mit Tris/NaCl waschen

10 min in PBS stehen lassen

10 min DAB, 150 µl pro OT

3 × mit H<sub>2</sub>O waschen, dann 1 x mit dest. H<sub>2</sub>O waschen

5 min mit Hämalun färben

10–15 min fließend wässern

mit dest. H<sub>2</sub>O waschen

mit Glyceringelatine eindecken

#### Färbungen auf Tumor-Gewebe

[0034] Tumorgewebe wurden gefärbt, um beurteilen zu können, auf wie vielen Karzinomen die zu untersu-

chenden Antikörper eine Reaktion zeigen.

PM-2  
Färbungen auf Normalgewebe

| Gewebe   | CAM5.2 | PM-2 | IgM-Kontrolle |
|----------|--------|------|---------------|
| Brust    | -      | -    | -             |
| Prostata | -      | -    | -             |
| Dickdarm | -      | -    | -             |
| Dünndarm | -      | -    | -             |
| Blase    | -      | -    | -             |

Färbungen auf Tumorgewebe

| Tumor                 | Positiv-Kontrolle | PM-2 | IgM-Kontrolle |
|-----------------------|-------------------|------|---------------|
| Bauchspeicheldrüse    | +                 | +    | -             |
| Lunge(Plattenepithel) | +                 | +    | -             |
| Lunge (Adeno)         | +                 | +    | -             |
| Brust                 | +                 | +    | -             |
| Magen                 | +                 | +    | -             |
| Nebenniere            | +                 | +    | -             |
| Dünndarm              | +                 | +    | -             |
| Dickdarm              | +                 | +    | -             |
| Speiseröhre           | +                 | +    | -             |
| Gebärmutter           | +                 | +    | -             |
| Eileiter              | +                 | +    | -             |
| Prostata              | +                 | +    | -             |

[0035] Cell-Death-ELISA<sup>PLUS</sup> (Firma Roche, Mannheim) Das Ausmaß der Apoptoseinduktion durch den Antikörper CM-1 wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> analysiert. Dieser Test basiert auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays, bei dem Peroxidase-konjugierte murine monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die gegen Histon- bzw. DNA-Komponenten gerichtet sind. Nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates kann dann anhand der Farbtintensität des Reaktionsproduktes die Menge der vorhandenen Nukleosomen und damit die relative Anzahl apoptotischer Zellen photometrisch bestimmt werden.

[0036] Hierzu werden 100 µl einer Zellsuspension ( $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ ) der verschiedenen Zell-Linien mit 100 µl der unverdünnten bzw. 1:1 verdünnten Antikörperüberstände in einer 96-Well-Platte für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen 10 min lang bei 200 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 200 µl Lysispuffer hinzugegeben, wodurch in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen erfolgt. Nach erneutem Zentrifugieren werden jeweils 20 µl des Überstandes in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten übertragen und dann 80 µl des Immunoreagentes (1/20 Anti-DNA-POD, 1/20 Anti-Histon Biotin, 18/20 Inkubationspuffer) hinzupipettiert. Zusätzlich wird eine im Testkit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Nachdem die Platten 2 Stunden lang bei ca. 250 rpm durchmischt worden sind, wird nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer (250 µl) 100 µl der ABTS-Lösung (1 ABTS-Tablette in 5 ml Substratpuffer) in jedes Well pipettiert. Nach erneutem Durchmischen spiegelt sich dann die Intensität der antikörperinduzierten Apoptose in einem intensiven grünen Farbniederschlag wider. Die Farbtintensität wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers bei  $\lambda = 415 \text{ nm}$  gegen die Referenzwellenlänge von 490 nm vermessen und daraus die Intensität der antikörperinduzierten Apoptose errechnet.

CellDeathELISA  
Antikörper

PM-2

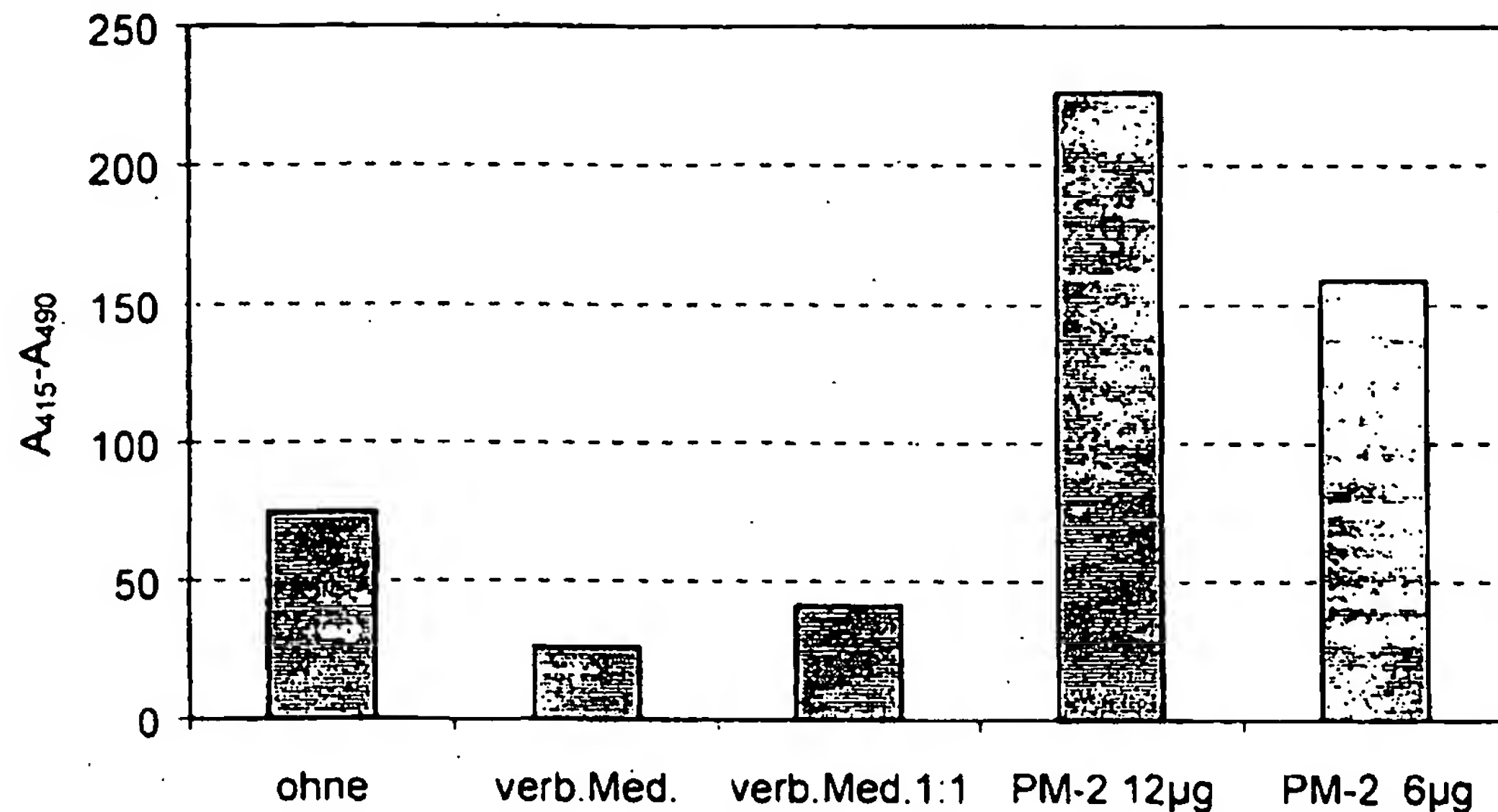


## Zell-Linie

BXPC-3

## Inkubationszeit

24 h



ohne: Negativkontrolle (RPMI 1460-Medium)

PM-2: 6,12 µg/ml Antikörperüberstand

[0037] Nach 24stündiger Inkubation zeigte der untersuchte Antikörper PM-2 im Vergleich zu den Negativkontrollen eine ausgeprägte Apoptose-Indikation, wobei der Effekt bei PM-2 den der Negativkontrolle um das 1,46 überstieg.

## MTT-Test

- Zellen trypsinisieren und in 10 ml RPMI-Vollmedium (RPMI-1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendieren
- Zellen zählen und auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml verdünnen
- in eine 96-Well-Platte 50 µl Zellsuspension pro Well pipettieren, (erste Reihe freilassen!), d. h. pro Well liegt eine Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen vor
- pro Well 50 µl Antikörper (verschiedene Verdünnungen in Vollmedium) hinzufügen
- 96-Well-Platte 24 h bzw. 48 h im Brutschrank inkubieren
- 50 µl MTT-Lösung in jedes Well pipettieren
- Platte 20 min im Brutschrank inkubieren
- Platte anschließend 10 min bei 2800 rpm zentrifugieren und den Überstand absaugen
- 150 µl DMSO pro Well hinzufügen und das Zellpellet resuspendieren
- Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm und 690 nm im ELISA-Reader bestimmen.

## MTT

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (SIGMA), 5 mg/ml in PBS lösen.

MTT-Test  
Antikörper

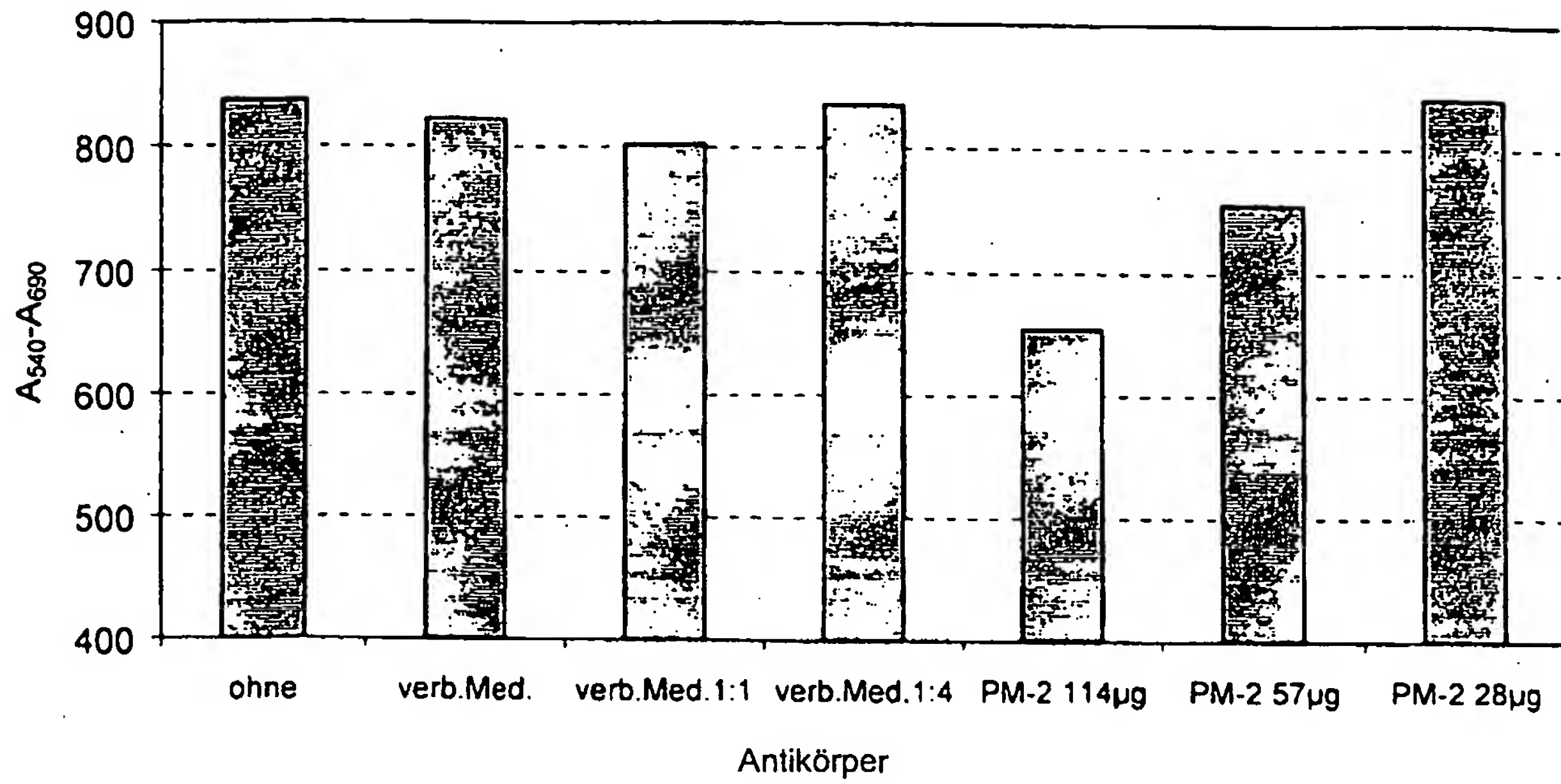
PM-2

Zell-Linie

BXPC-3 (Pankreas-Karzinom)

Inkubationszeit

[0038] 24 h



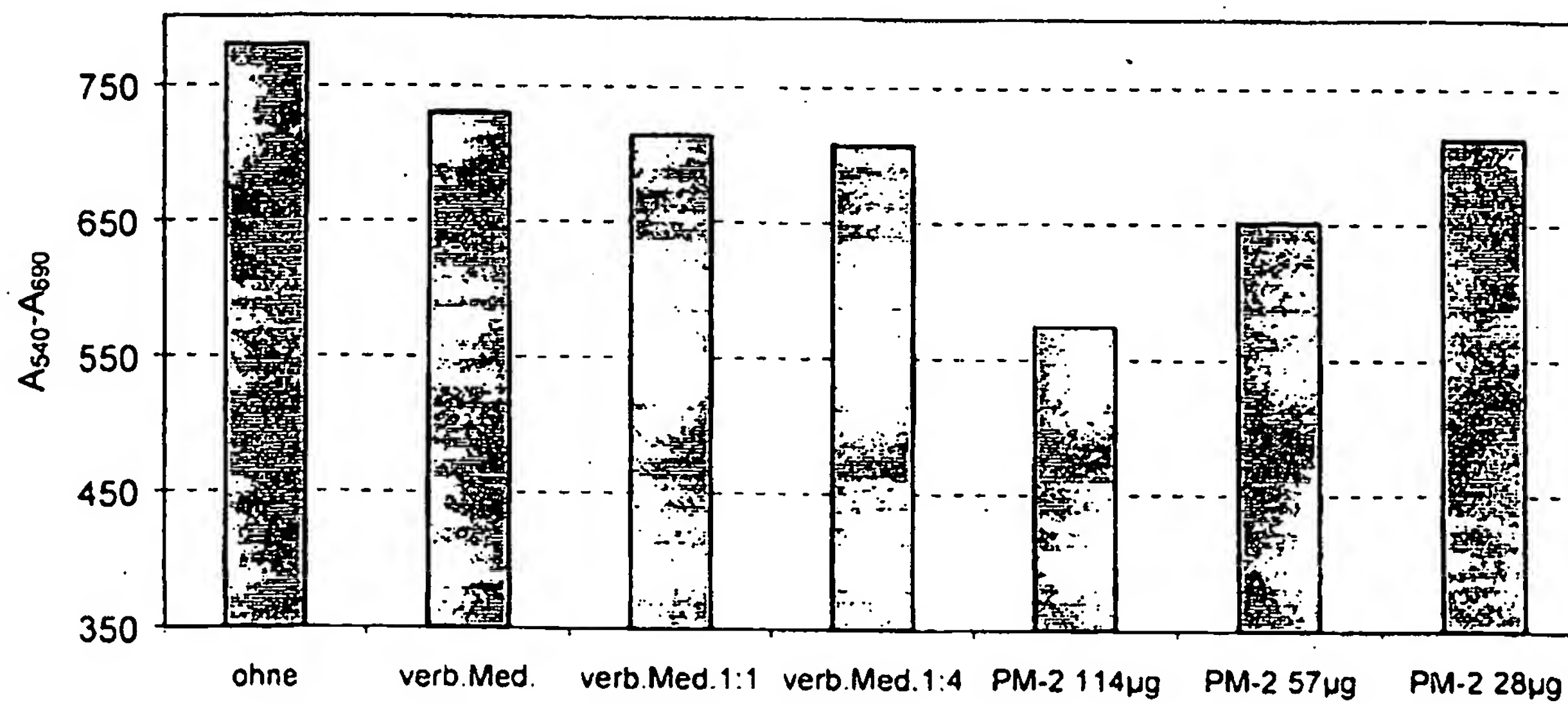
PM-2

Zell-Linie

BXPC-3 (Pankreas-Karzinom)

Inkubationszeit

48 h



<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad  
Prof. Dr. Vollmers, H. Peter

<120> Humaner monoklonaler Antikörper

<141> 2002-05-13

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> Sequenz der variablen Region der schweren Kette (V<sub>H</sub>) des Antikörpers PM-2 (Klon 10/89-89)

<221> V-Region

<222> (1)...(321)

<400>

|   |     |
|---|-----|
| ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat gcc atg agc | 60  |
| Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser |     |
| 1 5 10 15 20  |     |
| tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca gct att agt ggt agt ggt | 120 |
| Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp val Ser Ala Ile Aer Gly Ser Gly |     |
| 25 30 35 40   |     |
| ggg agt aca tac tac gca gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc | 180 |
| Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser |     |
| 45 50 55 60   |     |
| aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta tat tac | 240 |
| Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr |     |
| 65 70 75 80   |     |
| tgt gcg aaa ggt ggg gcc gaa ggc tgg tac gag tac tac tac tac tac ggt atg gac gtc | 300 |
| Cys Ala Lys Gly Gly Ala Glu Gly Trp Tyr Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val |     |
| 85 90 95 100  |     |
| tgg ggc caa ggg acc ctg gtc   | 321 |
| Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val   |     |
| 105   |     |

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad  
Prof. Dr. Vollmers, H. Peter

<120> Humaner monoklonaler Antikörper

<141> 2002-05-13

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> Sequenz der variablen Region der leichten Kette (V<sub>L</sub>) des Antikörpers PM-2  
(Klon 10/89-89)

<221> V-Region

<222> (1)...(348)

<400>

|   |     |
|---|-----|
| cag tct gcc ctg act cag cct gct tcc ctc tct gca tct cct gga gca tca gcc agt ctc | 60  |
| Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu |     |
| 1 5 10 15 20  |     |
| acc tgc acc ttg cgc agt ggc atc aat gtt ggt acc tac agg ata tac tgg tac cag cag | 120 |
| Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Thr Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln |     |
| 25 30 35 40   |     |
| aag cca ggg agt cct ccc cag tat ctc ctg agg tac aaa tca gac tca gat aag cag aag | 180 |
| Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Lys |     |
| 45 50 55 60   |     |
| ggc tct gga gtc ccc agc cgc ttc tct gga tcc aaa gat gct tcg gcc aat gca ggg att | 240 |
| Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile |     |
| 65 70 75 80   |     |
| tta ctc atc tct ggg ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt atg att tgg cac | 300 |
| Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His |     |
| 85 90 95 100  |     |
| agc agc gct tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt                 | 348 |
| Ser Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly                 |     |
| 105 110 115   |     |

### Patentansprüche

1. Humaner monoklonaler Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich aufweisen, oder funktionelles Fragment davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß wenigstens eine variable Region der leichten Ketten substanziiell jeweils die in Anlage 2 und/oder der schweren Ketten substanziiell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweist.

2. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1 mittels der Hybridoma-Technik, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hybridom-Zellen durch Fusion



der Heteromyelomzellen HAB-1 sowie deren Subklone mit B-Lymphozyten gewonnen werden, welche aus einem lymphatischen Organ, vorzugsweise der Milz oder Lymphknoten, eines Karzinom-Patienten entnommen sind.

3. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Lymphozyten einem Patient mit einem Karzinom des Magen, Dickdarm, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Speiseröhre, Prostata, Brust entnommen sind.

4. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er/es mittels der Rekombinanten-Methode hergestellt wird.

5. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er/es mittels der Gentechnologie hergestellt wird, unter Anwendung von Phagenbanken (phage display-Methode).

6. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Aufbau der konstanten Region der schweren Ketten dem von Immunglobulin M oder G (IgM oder IgG) entspricht.

7. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte funktionelle Fragment einer der Gruppen

$V_L$

$V_H$

Fv

Fc

Fab

Fab'

$F(ab')_2$

angehört.

8. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, daß einzelne Aminosäure-Gruppen substituiert, und/oder hinzugefügt, und/oder entfernt sind.

9. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 – 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Substanz angekoppelt ist, insbesondere eine radioaktive Substanz, und/oder ein Farbstoff, und/oder ein Enzym, und/oder ein Immunotoxin, und/oder ein Wachstumshemmer.

10. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 – 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine zweite Substanz angekoppelt ist, insbesondere zum qualitativen oder quantitativen Nachweis, zur Verringerung der Proliferation, zur Erzeugung der Apoptose zur Vermeidung von Metastasenbildung von Tumorzellen.

11. Verwendung des monoklonalen Antikörpers oder eines funktionellen Fragmentes davon nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Bekämpfung von Tumoren, dadurch gekennzeichnet, daß es/er zur Diagnose und/oder zur Prophylaxe und/oder zur Therapie insbesondere folgender Tumore eingesetzt wird:  
Karzinom des Dickdarm, der Bauchspeicheldrüse, der Prostata, der Gebärmutter, der Eileiter, der Nebenniere und/oder der Lunge,  
Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre oder der Lunge  
Magen-Karzinom  
duktales Karzinom der Brust.

12. Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Wirkstoff den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthält.

13. Diagnostikum, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Wirkstoff den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen